

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 761 363

21 N° d'enregistrement national :

97 11317

51 Int Cl<sup>6</sup> : C 07 K 14/435, A 61 K 7/48, 38/17, 48/00, C 12 N 15/  
12

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 11.09.97.  
30 Priorité : 28.03.97 FR 09703899.

43 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 02.10.98 Bulletin 98/40.

56 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.

60 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

71 Demandeur(s) : L'OREAL SOCIETE ANONYME —  
FR.

72 Inventeur(s) : SERRE GUY, SIMON MICHEL et  
WEBER VIVAT MARINA.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : L'OREAL.

54 POLYPEPTIDE PURIFIÉ DE L'ÉPIDERME ET SON UTILISATION.

57 L'invention a pour objet un polypeptide purifié, spéci-  
fique de l'épiderme, ayant un rôle dans la cohésion intercor-  
néocytaire. L'invention a également pour objet un mélange  
de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide puri-  
fié, des compositions les contenant, un procédé de traite-  
ment cosmétique destiné à renforcer la cohésion  
intercornéocytaire et un procédé de traitement cosmétique  
destiné à diminuer la cohésion intercornéocytaire, donc à  
favoriser la desquamation.

→ concerne la corne des cellules  
par sa séquence

FR 2 761 363 - A1



L'invention a pour objet un polypeptide purifié, un mélange de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide purifié, des compositions les contenant, un procédé de traitement cosmétique destiné à renforcer la cohésion intercornéocytaire et un procédé de traitement cosmétique destiné à diminuer la cohésion intercornéocytaire, donc à favoriser la desquamation.

La peau humaine est constituée de deux compartiments à savoir un compartiment profond, le derme, et un compartiment superficiel, l'épiderme.

Le derme fournit à l'épiderme un support solide. C'est également son élément nourricier. Il est principalement constitué de fibroblastes et d'une matrice extracellulaire composée elle-même principalement de collagène, d'élastine et d'une substance, dite substance fondamentale, composants synthétisés par le fibroblaste. On y trouve aussi des leucocytes, des mastocytes ou encore des macrophages tissulaires. Il est également constitué de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses.

L'épiderme humain naturel est composé principalement de trois types de cellules qui sont les kératinocytes, très majoritaires, les mélanocytes et les cellules de Langerhans. Chacun de ces types cellulaires contribue par ses fonctions propres au rôle essentiel joué dans l'organisme par la peau.

L'épiderme est conventionnellement divisé en une couche basale de kératinocytes qui constitue la couche germinative de l'épiderme, une couche dite épineuse constituée de plusieurs couches de cellules polyédriques disposées sur les cellules germinatives, une couche dite granuleuse constituée de cellules aplaties contenant des inclusions cytoplasmiques distinctes, les grains de kératohyaline, et enfin une couche supérieure appelée couche cornée (ou stratum corneum), constituée de kératinocytes au stade terminal de leur différenciation appelés cornéocytes. Ceux-ci sont des cellules momifiées, anucléées qui dérivent des kératinocytes.

Les cornéocytes sont principalement composés d'une matrice fibreuse contenant des cytokératines, entourée d'une structure très résistante de 15 nm d'épaisseur, appelée enveloppe cornée ou cornifiée. L'empilement de ces cornéocytes constitue la couche cornée qui est responsable de la fonction de barrière de l'épiderme. Au cours du processus normal de desquamation, les cornéocytes les plus superficiels se détachent de la surface de l'épiderme.

Des structures intercellulaires dérivant des desmosomes, appelées cornéosomes ou cornéodesmosomes, ont été décrites dans la couche cornée. Des études récentes ont montré leur importance majeure dans la cohésion intercornéocytaire ainsi que dans le processus de desquamation. En particulier, une corrélation étroite existe entre la dissociation cellulaire et la protéolyse de certains composants cornéodesmosomiaux comme la desmoglérine I.

Plusieurs protéases à sérine de type trypsine ou chymotrypsine semblent être impliquées dans la protéolyse des cornéodesmosomes, en particulier l'enzyme chymotrypsique de la couche cornée (stratum corneum chymotryptic enzyme).

De nombreuses pathologies cutanées se caractérisent par la production d'une couche cornée épaissie et par une desquamation anormale, c'est-à-dire par une hyperkératose. Celle-ci peut survenir sur tout territoire anatomique cutané et dans des contextes cliniques très variés. Son substratum physiopathologique et sa cause sont variés.

A titre d'exemples on peut citer :

- la xérose (ou sécheresse cutanée),
- les ichthyoses,
- le psoriasis,
- certaines lésions tumorales bénignes ou malignes,
- les hyperkératoses réactionnelles.

D'autres pathologies se caractérisent par une transdifférenciation ou métaplasie, au niveau de muqueuses, malpighiennes ou non, mais normalement non cornifiées, qui deviennent cornifiées, c'est-à-dire se revêtent d'un épithélium anormal, producteur à sa surface d'une couche cornée. Bien que les muqueuses génitales et celles des voies aérodigestives supérieures soient le plus souvent concernées, ces métaplasies peuvent siéger dans divers territoires anatomiques.

A titre d'exemples on peut citer :

- la leukokératose du col utérin au cours du prolapsus,
- les leukokératoses buccales,
- les lésions tumorales bénignes kératosiques des muqueuses malpighiennes.

A l'inverse, certaines manifestations pathologiques entraînent un amincissement de l'épiderme et en particulier de la couche cornée, se traduisant par une fragilité

excessive du revêtement cutané. Celle-ci peut siéger dans divers territoires anatomiques, sa cause est variable et elle peut être constitutionnelle ou acquise.

A titre d'exemples on peut citer :

- 5 - les troubles trophiques cutanés des membres inférieurs chez les patients porteurs de pathologies vasculaires : varices, artériopathies (diabète, artériosclérose...),
- les troubles trophiques cutanés dans le cadre d'un syndrome algo-dystrophique,
- 10 - les troubles trophiques consécutifs à une cicatrisation anormale.

La purification et la connaissance des polypeptides impliqués dans la cohésion intercornéocytaire est une des voies qui pourrait permettre l'élaboration de produits destinés à lutter contre les effets d'un excès ou d'un défaut en polypeptides de ce type en particulier à la surface de la peau.

15 Un des objets de l'invention est de fournir un polypeptide impliqué dans la cohésion intercornéocytaire sous forme purifiée.

Après de longs et laborieux travaux du fait de sa faible représentation parmi les protéines de l'épiderme, de sa grande instabilité et de sa sensibilité élevée aux protéases, la demanderesse a mis en évidence, isolé et purifié par des techniques biochimiques à partir d'épiderme humain, un polypeptide spécifique des épithéliums cornifiés. Ce polypeptide, que l'on nommera également par ailleurs dans le texte "cornéodesmosine" est exprimé dans la couche cornée de l'épiderme et est impliqué dans la cohésion intercornéocytaire. La demanderesse en a déterminé la séquence primaire en acides aminés.

L'invention a donc pour objet un polypeptide purifié, caractérisé par le fait qu'il répond à la séquence d'acides aminés :

30

1	M	G	S	S	R	A	P	W	M	G	R	V	G	G	H	G	M	M	A	L	L	L	A	G	L
26	L	L	P	G	T	L	A	K	S	I	G	T	F	S	D	P	C	K	D	P	T	R	I	T	S
51	P	N	D	P	C	L	T	G	K	G	D	S	S	G	F	S	S	Y	S	G	S	S	S	S	G
76	S	S	I	S	S	A	R	S	S	G	G	G	S	S	G	S	S	S	G	S	S	I	A	Q	G
101	G	S	A	G	S	F	K	P	G	T	G	Y	S	Q	V	S	Y	S	S	G	S	G	S	S	L
126	Q	G	A	S	G	S	S	Q	L	G	S	S	S	S	H	S	G	S	S	G	S	H	S	G	S
151	S	S	S	H	S	S	S	S	S	S	F	Q	F	S	S	S	S	F	Q	V	G	N	G	S	A
176	L	P	T	N	D	N	S	Y	R	G	I	L	N	P	S	Q	P	G	Q	S	S	S	S	S	Q
201	T	S	G	V	S	S	S	G	Q	S	V	S	S	N	Q	R	P	C	S	S	D	I	P	D	S
226	P	C	S	G	G	P	I	V	S	H	S	G	P	Y	I	P	S	S	H	S	V	S	G	G	Q

251 R P V V V V V D Q H G S G A P G V V Q G P P C S N  
 276 G G L P G K P C P P I T S V D K S Y G G Y E V V G  
 301 G S S D S Y L V P G M T Y S K G K I Y P V G Y F T  
 326 K E N P V K G S P G V P S F A A G P P I S E G K Y  
 351 F S S N P I I P S Q S A A S S A I A F Q P V G T G  
 376 G V Q L C G G G S T G S K G P C S P S S S R V P S  
 401 S S S I S S S A G S P Y H P C G S A S Q S P C S P  
 426 P G T G S F S S S S S S Q S S G K I I L Q P C G S  
 451 K S S S S G H P C M S V S S L T L T G G P D G S P  
 476 H P D P S A G A K P C G S S S A G K I P C R S I R  
 501 D I L A Q V K P L G P Q L A D P E V F L P Q G E L  
 526 L D S P

La séquence primaire en acides aminés du polypeptide est présentée ici sous  
 une forme qui utilise le code à une lettre couramment utilisé dans l'art antérieur et  
 dont on peut trouver une explication dans "Principes de biochimie" Lehninger A.  
 5 L., Flammarion éditeur, 1985. La numérotation commence du côté aminoterminal  
 du polypeptide et se poursuit jusqu'à l'extrémité carboxyterminale de celui-ci.

Le polypeptide de l'invention peut être d'origine naturelle ou synthétique. Par  
 synthétique on entend ici tout polypeptide obtenu chimiquement ou par  
 10 production dans un organisme après introduction dans cet organisme des  
 éléments nécessaires à cette production.

Le polypeptide de l'invention peut être issu de toute origine possible à savoir soit  
 animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine,  
 15 soit végétale, soit de micro-organismes (virus, phages, bactéries entre autres) ou  
 encore de champignons, sans préjuger du fait qu'il soit présent de manière  
 naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

Préférentiellement, le polypeptide de l'invention est d'origine naturelle, purifié à  
 20 partir de tissus de mammifères, particulièrement à partir de peau de mammifères.

Préférentiellement, le polypeptide de l'invention est purifié à partir de peau  
 humaine et encore plus préférentiellement à partir d'épiderme humain.

25 Comme indiqué précédemment, la cohésion intercornéocytaire est apparemment  
 due entre autres à l'existence dans la couche cornée de polypeptides spécifiques  
 des structures impliquées dans la jonction intercornéocytaire.

Ainsi, le polypeptide de l'invention est spécifique de la couche cornée et de la

couche granuleuse et, préférentiellement, le polypeptide selon l'invention est spécifique des structures impliquées dans la jonction intercornéocytaire, particulièrement des cornéodesmosomes.

On sait qu'en général les polypeptides matures que l'on trouve dans les cellules proviennent de la maturation de précurseurs qui contiennent dans leur séquence la séquence du polypeptide mature.

Ainsi, l'invention concerne également tout polypeptide dont la séquence est en partie constituée par la séquence du polypeptide de l'invention.

Il est connu également que les polypeptides peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la formation de liaisons disulfure, les clivages protéolytiques spécifiques, l'addition de glucides (glycosylation), la phosphorylation en particulier au niveau des sérines et/ou des thréonines et/ou des tyrosines, et/ou l'association à des lipides.

L'invention concerne donc le polypeptide de l'invention ayant subi ou non des modifications post-traductionnelles.

Le polypeptide de l'invention peut avoir subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles.

Préférentiellement, le polypeptide selon l'invention est glycosylé et/ou phosphorylé.

On sait classer les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique. Préférentiellement, le polypeptide de l'invention est basique.

Bien entendu la séquence primaire en acides aminés, ainsi que les diverses modifications post-traductionnelles subies par le polypeptide font que ledit polypeptide peut être caractérisé par son poids moléculaire, exprimé en kilodaltons. Le polypeptide de l'invention a un poids moléculaire apparent déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (PAGE-SDS) compris entre 50 et 60 kilodaltons, préférentiellement, entre 52 et 56 kilodaltons.

Très préférentiellement, le polypeptide de l'invention est un polypeptide glycosylé,

phosphorylé, basique d'un poids moléculaire apparent compris entre 50 et 60, de préférence entre 52 et 56, kilodaltons.

5 Il est par ailleurs connu que la séquence primaire en acides aminés d'un polypeptide détermine des sites spécifiquement reconnus par des protéases qui une fois la reconnaissance de ces sites effective vont, avec ou sans fixation audit polypeptide, induire son clivage par protéolyse.

10 Ainsi, l'invention concerne également un mélange de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide de l'invention.

15 Comme décrit précédemment certaines pathologies peuvent être dues à un excès de desquamation dont on peut supposer qu'il est dû à un défaut en polypeptides impliqués dans la cohésion intercornéocytaire.

20 Un autre objet de l'invention est donc de fournir des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide ou un mélange de polypeptides tel que décrit précédemment.

25 Préférentiellement, la composition selon l'invention est destinée à être appliquée à la surface de la peau.

30 Comme vu précédemment, certaines manifestations pathologiques entraînent un amincissement de l'épiderme et en particulier de la couche cornée, se traduisant par une fragilité excessive du revêtement cutané, qui peut siéger dans tout territoire anatomique cutané, être de cause variée constitutionnelle ou acquise.

35 L'invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide ou d'un mélange tels que décrits précédemment pour renforcer la cohésion intercornéocytaire et/ou induire l'épaississement de la couche cornée. A ce titre le polypeptide de l'invention ou le mélange de polypeptides peut être utilisé pour traiter l'amincissement de l'épiderme et en particulier de la couche cornée ou encore une fragilité excessive du revêtement cutané.

Particulièrement le polypeptide de l'invention ou le mélange de polypeptides peut être utilisé pour traiter les troubles trophiques cutanés, par exemple des patients porteurs de pathologies vasculaires telles que les varices ou les artériopathies

(diabète, artériosclérose...), les troubles trophiques cutanés des patients porteurs de syndromes algo-dystrophiques ou ceux consécutifs à des troubles de la cicatrisation.

- 5 De la même façon, le polypeptide de l'invention ou le mélange de polypeptides peut être utilisé pour provoquer un épaissement localisé de la couche cornée au niveau de territoires cutanés devant subir des microtraumatismes répétés.

- 10 A titre d'exemple on peut citer le traitement préventif des bulles sous-épidermiques ("ampoules") chez les sportifs.

- 15 L'invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide ou d'un mélange tels que décrits précédemment dans une composition cosmétique ou pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à renforcer la cohésion intercornéocytaire et/ou induire l'épaississement de la couche cornée. Elle a trait aussi à un procédé de traitement cosmétique destiné à renforcer la cohésion intercornéocytaire et/ou induire l'épaississement de la couche cornée, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau du sujet à traiter une composition telle que décrite précédemment.

- 20 L'analyse de la séquence primaire en acides aminés de la protéine selon l'invention montre qu'elle présente des sites de reconnaissance et de fixation pour des protéases connues ou des sites spécifiques de clivage par des agents chimiques. On peut citer comme exemple les sites pour la Chymotrypsine, la Cathépsine, la protéinase K, la Subtilisine, la protéase V8, la Thermolysine, la Thrombine, la Trypsine, la Papaïne, la Pepsine, la Proline-Endopeptidase, 25 l'Endoprotéinase GluC, l'Endoprotéinase LysC, l'Endoprotéinase AspN, l'Endoprotéinase ArgC (Clostripaïne), la Myxobacter AL117, l'Elastase, l'enzyme chymotrypsique de la couche cornée, le bromure de cyanogène, le N-chlorosuccinimide ou encore les sites spécifiques de l'hydrolyse acide (70% d'acide formique, 7M Guanidine-HCl, 40°C, 24h).

- 35 La cohésion intercornéocytaire est apparemment due à l'existence, dans la couche cornée, de polypeptides spécifiques des structures impliquées dans la jonction intercornéocytaire comme en particulier le polypeptide de l'invention. On a vu que certaines pathologies hyperkératosiques pourraient être liées à un excès de cohésion intercornéocytaire, dû en particulier au polypeptide de l'invention.



Un autre objet de l'invention est de proposer un procédé de traitement cosmétique pour lutter contre les excès de cohésion intercornéocytaire et donc pour augmenter la desquamation et en particulier les excès dûs au polypeptide de l'invention, procédé qui consiste à appliquer sur la peau une composition cosmétique comprenant au moins une protéase présentant un site spécifique de reconnaissance et/ou de fixation et de coupure au sein de la séquence primaire d'acides aminés du polypeptide de l'invention.

Ainsi, l'invention a pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'au moins une protéase active sur le polypeptide de l'invention, choisie parmi l'Endoprotéinase LysC, l'Endoprotéinase GluC, la Proline-Endopeptidase, la Thrombine, la Pepsine, la Myxobacter AL117 et l'Elastase.

Ces protéases peuvent être isolées à partir de plantes, d'animaux, de bactéries, de virus ou de champignons.

Le polypeptide de l'invention peut être glycolysé. Ainsi, la composition telle que définie précédemment peut contenir en outre une glycosidase qui peut être choisie parmi celles isolées de plantes, d'animaux, de champignon ou encore de micro-organismes, en particulier de bactéries. On citera à titre d'exemple les neuraminidases, les mannosidases, les galactosidases, les glucosidases, les N-acétylgucosaminidases et les N-acétylgalactosaminidases.

Comme vu précédemment certaines pathologies se caractérisent par la production d'une couche cornée épidermique épaissie et par une desquamation anormale, c'est-à-dire par une hyperkératose qui peut survenir dans tout territoire anatomique cutané, dans divers contextes cliniques et dont le substratum physiopathologique et la cause peuvent être variés.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement cosmétique pour lutter contre les excès de cohésion intercornéocytaire consistant en l'application sur la peau d'une composition cosmétique comprenant une protéase telle que définie précédemment.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant une protéase, telle que définie précédemment, destinée à traiter par exemple la

xérose (ou sécheresse cutanée), les ichthyoses, le psoriasis, l'hyperkératose de certaines lésions tumorales bénignes ou malignes, les kératoses réactionnelles.

5 L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant une protéase, telle que définie précédemment, destinée à traiter les pathologies se caractérisant par une transdifférenciation ou métaplasie, au niveau de muqueuses, malpighiennes ou non, mais normalement non cornifiées, qui deviennent cornifiées comme par exemple la leukokératose du col utérin au cours du prolapsus, les leukokératoses buccales, ou encore les lésions tumorales  
10 hyperkératosiques bénignes ou malignes des muqueuses malpighiennes.

On sait qu'une protéine est synthétisée dans les cellules à partir d'une matrice d'acides désoxyribonucléiques codant pour ladite protéine. On sait également que le code génétique est dégénéré. Ainsi, la séquence d'acides aminés du  
15 polypeptide de l'invention peut être issue de différentes séquences d'acides désoxyribonucléiques, naturelles ou synthétiques. Par séquence d'acides désoxyribonucléiques synthétique, on entend ici toute séquence obtenue chimiquement ou par manipulation génétique.

Les dites séquences d'acides désoxyribonucléiques peuvent être issues de toutes  
20 origines possibles à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes (virus, phages, bactéries entre autres) ou encore de champignons, sans préjuger du fait qu'elles soient présentes de manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

25 La demanderesse a isolé, purifié et séquencé par des techniques de biologie moléculaire en particulier le criblage de banques d'expression d'acides désoxyribonucléiques complémentaires préparées à partir d'épiderme humain, un fragment d'acides désoxyribonucléiques codant pour le polypeptide de l'invention.

30 L'invention a donc également pour objet toutes séquences d'acides désoxyribonucléiques, naturelles ou synthétiques, dont tout ou partie code pour la séquence primaire d'acides aminés du polypeptide de l'invention.

35 Au cours de ces travaux, la demanderesse a pu isoler et purifier une séquence d'acides désoxyribonucléiques codant pour la séquence primaire d'acides aminés du polypeptide de l'invention à partir de peau humaine.

Ainsi, l'invention a également pour objet une séquence nucléotidique isolée

codant pour le polypeptide de l'invention ou toutes séquences nucléotidiques naturelles ou synthétiques contenant la dite séquence.

Particulièrement l'invention a pour objet un fragment isolé d'acide  
5 désoxyribonucléique comprenant au moins la séquence nucléotidique codante  
suivante :

1	<u>ATG</u>	GGC	TCG	TCT	CGG	GCA	CCC	TGG	ATG	GGG	CGT	GTG	GGT	GGG	CAC
46	GGG	ATG	ATG	GCA	CTG	CTG	CTG	GCT	GGT	CTC	CTC	CTG	CCA	GGG	ACC
10	91	TTG	GCT	AAG	AGC	ATT	GGC	ACC	TTC	TCA	GAC	CCC	TGT	AAG	GAC
136	ACG	CGT	ATC	ACC	TCC	CCT	AAC	GAC	CCC	TGC	CTC	ACT	GGG	AAG	GGT
181	GAC	TCC	AGC	GGC	TTC	AGT	AGC	TAC	AGT	GGC	TCC	AGC	AGT	TCT	GGC
226	AGC	TCC	ATT	TCC	AGT	GCC	AGA	AGC	TCT	GGT	GGT	GGC	TCC	AGT	GGT
271	AGC	TCC	AGC	GGA	TCC	AGC	ATT	GCC	CAG	GGT	GGT	TCT	GCA	GGA	TCT
15	316	TTT	AAG	CCA	GGA	ACG	GGG	TAT	TCC	CAG	GTC	AGC	TAC	TCC	GGA
361	TCT	GGC	TCT	AGT	CTA	CAA	GGT	GCA	TCC	GGT	TCC	TCC	CAG	CTG	GGG
406	AGC	AGC	AGC	TCT	CAC	TCG	GGA	AGC	AGC	GGC	TCT	CAC	TCG	GGA	AGC
451	AGC	AGC	TCT	CAT	TCG	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	TTT	CAG	TTC	AGC	AGC
496	AGC	AGC	TTC	CAA	GTA	GGG	AAT	GGC	TCT	GCT	CTG	CCA	ACC	AAT	GAC
20	541	AAC	TCT	TAC	CGC	GGA	ATA	CTA	AAC	CCT	TCC	CAG	CCT	GGA	CAA
586	TCT	TCC	TCT	TCC	CAA	ACC	TCT	GGG	GTA	TCC	AGC	AGT	GGC	CAA	AGC
631	GTC	AGC	TCC	AAC	CAG	CGT	CCC	TGT	AGT	TCG	GAC	ATC	CCC	GAC	TCT
676	CCC	TGC	AGT	GGA	GGG	CCC	ATC	GTC	TCG	CAC	TCT	GGC	CCC	TAC	ATC
721	CCC	AGC	TCC	CAC	TCT	GTG	TCA	GGG	GGT	CAG	AGG	CCT	GTG	GTG	GTG
25	766	GTG	GTG	GAC	CAG	CAC	GGT	TCT	GGT	GCC	CCT	GGA	GTG	GTT	CAA
811	CCC	CCC	TGT	AGC	AAT	GGT	GGC	CTT	CCA	GGC	AAG	CCC	TGT	CCC	CCA
856	ATC	ACC	TCT	GTA	GAC	AAA	TCC	TAT	GGT	GGC	TAC	GAG	GTG	GTG	GGT
901	GGC	TCC	TCT	GAC	AGT	TAT	CTG	GTT	CCA	GGC	ATG	ACC	TAC	AGT	AAG
946	GGT	AAA	ATC	TAT	CCT	GTG	GGC	TAC	TTC	ACC	AAA	GAG	AAC	CCT	GTG
30	991	AAA	GGC	TCT	CCA	GGG	GTC	CCT	TCC	TTT	GCA	GCT	GGG	CCC	ATC
1036	TCT	GAG	GGC	AAA	TAC	TTC	TCC	AGC	AAC	CCC	ATC	ATC	CCC	AGC	CAG
1081	TCG	GCA	GCT	TCC	TCG	GCC	ATT	GCG	TTC	CAG	CCA	GTG	GGG	ACT	GGT
1126	GGG	GTC	CAG	CTC	TGT	GGA	GGC	GGC	TCC	ACG	GGC	TCC	AAG	GGA	CCC
1171	TGC	TCT	CCC	TCC	AGT	TCT	CGA	GTC	CCC	AGC	AGT	TCT	AGC	ATT	TCC
35	1216	AGC	AGC	GCC	GGT	TCA	CCC	TAC	CAT	CCC	TGC	GGC	AGT	GCT	TCC
1261	AGC	CCC	TGC	TCC	CCA	CCA	GGC	ACC	GGC	TCC	TTC	AGC	AGC	AGC	TCC
1306	AGT	TCC	CAA	TCG	AGT	GGC	AAA	ATC	ATC	CTT	CAG	CCT	TGT	GGC	AGC
1351	AAG	TCC	AGC	TCT	TCT	GGT	CAC	CCT	TGC	ATG	TCT	GTC	TCC	TCC	TTG
1396	ACA	CTG	ACT	GGG	GGC	CCC	GAT	GGC	TCT	CCC	CAT	CCT	GAT	CCC	TCC
40	1441	GCT	GGT	GCC	AAG	CCC	TGT	GGC	TCC	AGC	AGT	GCT	GGA	AAG	ATC
1486	TGC	CGC	TCC	ATC	CGG	GAT	ATC	CTA	GCC	CAA	GTG	AAG	CCT	CTG	GGG
1531	CCC	CAG	CTA	GCT	GAC	CCT	GAA	GTT	TTC	CTA	CCC	CAA	GGA	GAG	TTA
1576	CTC	GAC	AGT	CCA	<u>TAA</u>										

45 L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou  
pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au  
moins ladite séquence d'acides désoxyribonucléiques, ou une séquence d'acides  
ribonucléiques sens ou antisens correspondants. Plus particulièrement ladite  
composition est destinée à renforcer ou diminuer la cohésion intercornéocytaire.

50

Elle a également pour objet l'utilisation desdites séquences d'acides

désoxyribonucléiques pour la production du polypeptide de l'invention ou d'un acide ribonucléique correspondant par toute technique connue comme par exemple la synthèse in vitro, à partir de milieux reconstitués ou la synthèse par des organismes.

5

L'invention a également pour objet l'utilisation du polypeptide de l'invention ou de ses fragments de protéolyse, et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer ou purifier, éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, structurale ou fonctionnelle, susceptible de se lier spécifiquement audit polypeptide purifié ou auxdits fragments de protéolyse purifiés ou audit peptide synthétique. Cette molécule peut notamment correspondre à d'autres protéines structurales spécifiques des cornéodesmosomes et diverses enzymes de la couche cornée, de type "protéases", "glycosidases" ou "phosphatases".

10

L'invention a également pour objet l'utilisation du polypeptide de l'invention ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer des antisérums et anticorps monoclonaux spécifiques, visant notamment à purifier cette protéine et ses fragments. Par extension, l'invention a également pour objet toute utilisation de ladite séquence pour produire des anticorps ou fragments d'anticorps recombinants, quel que soit le système biologique utilisé pour produire ces derniers.

20

Quelle que soit leur nature, les compositions de l'invention peuvent être ingérées, injectées ou appliquées sur la peau (sur toute zone cutanée du corps) ou les muqueuses (buccale, jugale, gingivale, génitale, conjonctivale, ...).

25

De préférence, les compositions de l'invention sont appliquées sur la peau ou les muqueuses.

30

Selon le mode d'administration, les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées.

35

Pour une application topique sur la peau, la composition peut avoir la forme notamment de solution aqueuse ou huileuse ou de dispersion du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H), ou de suspensions ou émulsions de consistance molle du type crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou

microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique ou de mousses ou encore sous forme de compositions pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression. Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

5

Pour l'injection, la composition peut se présenter sous forme de lotion aqueuse, huileuse ou sous forme de sérum. Pour les yeux, elle peut se présenter sous forme de gouttes et pour l'ingestion, elle peut se présenter sous forme de capsules, de granulés, de sirops ou de comprimés.

10

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

15

Ces compositions constituent notamment des crèmes de nettoyage, de protection, de traitement ou de soin pour le visage, pour les mains, pour les pieds, pour les grands plis anatomiques ou pour le corps (par exemple crèmes de jour, crèmes de nuit, crèmes démaquillantes, crèmes de fond de teint, crèmes anti-solaires), des fonds de teint fluides, des laits de démaquillage, des laits corporels de protection ou de soin, des laits anti-solaires, des lotions, gels ou mousses pour le soin de la peau, comme des lotions de nettoyage, des lotions anti-solaires, des lotions de bronzage artificiel, des compositions pour le bain, des compositions désodorisantes comprenant un agent bactéricide, des gels ou lotions après-rasage, des crèmes épilatoires, des compositions contre les piqûres d'insectes, des compositions anti-douleur, des compositions pour traiter certaines maladies de la peau comme l'eczéma, la rosacée, le psoriasis, les lichens, les prurits sévères.

20

25

30

Les compositions selon l'invention peuvent également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage.

35

Les compositions peuvent aussi être conditionnées sous forme de composition pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression.

40

La composition selon l'invention peut aussi être une composition pour les soins du cuir chevelu, et notamment un shampooing, une lotion de mise en plis, une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, une composition de teintures (notamment teintures d'oxydation) éventuellement sous forme de shampooings colorants, des lotions restructurantes pour les cheveux, une composition de permanente

(notamment une composition pour le premier temps d'une permanente), une lotion ou un gel antichute, un shampoing antiparasitaire, etc.

La composition peut aussi être à usage bucco-dentaire, par exemple une pâte dentifrice. Dans ce cas, la composition peut contenir des adjuvants et additifs usuels pour les compositions à usage buccal et notamment des agents tensioactifs, des agents épaississants, des agents humectants, des agents de polissage tels que la silice, divers ingrédients actifs comme les fluorures, en particulier le fluorure de sodium, et éventuellement des agents édulcorants comme le saccharinate de sodium.

Lorsque la composition est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5 % à 80 % en poids, et de préférence de 5 % à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsionnants et les coémulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsionnant et le coémulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3 % à 30 % en poids, et de préférence de 0,5 à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition. L'émulsion peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

Lorsque la composition est une solution ou un gel huileux, la phase grasse peut représenter plus de 90 % du poids total de la composition.

De façon connue, la composition cosmétique peut contenir également des adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les additifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique, et par exemple de 0,01 % à 10 % du poids total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans les sphérules lipidiques.

Comme huiles ou cires utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles végétales (fraction liquide du beurre de karité, huile de tournesol), les huiles animales (perhydrosqualène), les huiles de synthèse (huile de Purcellin), les huiles ou cires siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers), les cires d'abeille, de carnauba ou paraffine.

On peut ajouter à ces huiles des alcools gras et des acides gras (acide stéarique). Comme émulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple le stéarate de glycérol, le polysorbate 60 et le mélange de PEG-6/PEG-32/Glycol Stéarate vendu sous la dénomination de Tefose<sup>R</sup> 63 par la société Gattefosse.

5

Comme solvants utilisables dans l'invention, on peut citer les alcools inférieurs, notamment l'éthanol et l'isopropanol, le propylène glycol.

10

Comme gélifiants hydrophiles utilisables dans l'invention, on peut citer les polymères carboxyviniliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides tels que l'hydroxypropylcellulose, les gommes naturelles et les argiles, et, comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras comme les stéarates d'aluminium et la silice hydrophobe, éthylcellulose, polyéthylène.

15

La composition peut contenir d'autres actifs hydrophiles comme les protéines ou les hydrolysats de protéines, les acides aminés, les polyols, l'urée, l'allantoïne, les sucres et les dérivés de sucre, les vitamines hydrosolubles, les extraits végétaux et les hydroxyacides.

20

Comme actifs lipophiles, on peut utiliser le rétinol (vitamine A) et ses dérivés, le tocophérol (vitamine E) et ses dérivés, les acides gras essentiels, les céramides, les huiles essentielles, l'acide salicylique et ses dérivés.

25

Selon l'invention la composition peut associer au moins un extrait d'au moins une Iridacée à d'autres agents actifs destinés notamment à la prévention et/ou au traitement des affections cutanées. Parmi ces agents actifs, on peut citer à titre d'exemple :

30

- les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée tels que l'acide rétinoïque et ses isomères, le rétinol et ses esters, la vitamine D et ses dérivés, les oestrogènes tels que l'oestradiol, l'acide kojique ou l'hydroquinone ;

35

- les antibactériens tels que le phosphate de clindamycine, l'érythromycine ou les antibiotiques de la classe des tétracyclines ;
- les antiparasitaires, en particulier le métronidazole, le crotamiton ou les pyrèthri-noïdes ;
- les antifongiques, en particulier les composés appartenant à la classe des

imidazoles tels que l'éconazole, le kétoconazole ou le miconazole ou leurs sels, les composés polyènes, tels que l'amphotéricine B, les composés de la famille des allylamines, tels que la terbinafine, ou encore l'octopirox ;

- les agents antiviraux tels que l'acyclovir ;

5 - les agents anti-inflammatoires stéroïdiens, tels que l'hydrocortisone, le valérate de bétaméthasone ou le propionate de clobétasol, ou les agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens comme par exemple l'ibuprofène et ses sels, le diclofénac et ses sels, l'acide acétylsalicylique, l'acétaminophène ou l'acide glycyrrhizique ;

10 - les agents anesthésiques tels que le chlorhydrate de lidocaïne et ses dérivés ;

- les agents antiprurigineux comme la thénaldine, la triméprazine ou la cyproheptadine ;

- les agents kératolytiques tels que les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -hydroxycarboxyliques ou  $\beta$ -cétocarboxyliques, leurs sels, amides ou esters et plus particulièrement les

15 hydroxyacides tels que l'acide glycolique, l'acide lactique, l'acide salicylique, l'acide citrique et de manière générale les acides de fruits, et l'acide n-octanoyl-5-salicylique ;

- les agents anti-radicaux libres, tels que l' $\alpha$ -tocophérol ou ses esters, les superoxyde dismutases, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et  
20 ses esters ;

- les antiséborrhéiques tels que la progestérone ;

- les antipelliculaires comme l'octopirox ou la pyrithione de zinc ;

- les antiacnéiques comme l'acide rétinoïque ou le peroxyde de benzoyle.

25 Ainsi, selon un mode particulier, la composition selon l'invention comprend également au moins un agent choisi parmi les agents antibactériens, antiparasitaires, antifongiques, antiviraux, anti-inflammatoires, antiprurigineux, anesthésiques, kératolytiques, anti-radicaux libres, anti-séborrhéiques, antipelliculaires, antiacnéiques et/ou les agents diminuant la différenciation et/ou  
30 la prolifération et/ou la pigmentation cutanée.

#### EXEMPLES :

##### Anticorps monoclonaux :

Les anticorps monoclonaux murins G36-19, F28-27 et B17-21 (IgG1) spécifiques  
35 du polypeptide de l'invention, la cornéodesmosine, font partie d'une série d'anticorps dirigés contre des antigènes de différenciation épidermique, produits après immunisation d'une souris avec un homogénat de couche cornée plantaire humaine, puis caractérisés. L'ascite de l'anticorps monoclonal MOPC-21 (IgG1)



(Sigma Chemical Co., St Louis, MO) a été utilisée comme contrôle négatif. Le kit d'anticorps anti-phosphosérine de Biomol Feinchenukalien GmbH ( Anticorps monoclonal 1C8, 4A3, 4A9 et 4H4) et l'anticorps monoclonal PSR45 de Sigma ont aussi été utilisés.

5

### **Isolement et caractérisation du polypeptide :**

#### **Extraction protéique séquentielle :**

A partir de peau mammaire (provenant de plasties mammaires de réduction), l'épiderme a été séparé du derme mécaniquement après traitement à la chaleur de la peau pendant 5 minutes à 56°C dans un tampon phosphate, puis homogénéisé de façon séquentielle, à 4°C, dans des volumes égaux des tampons suivants (trois fois dans chaque tampon : i) tampon TE : Tris-HCl 40 mM pH 7,5; éthylènediaminetétraacétate (EDTA) 10 mM; phénylméthylsulfonyl fluoride 0,25 mM et 2 µg/ml de chacun des inhibiteurs suivants: aprotinine, pepstatine A et leupeptine ; ii) tampon TENP40 : TE contenant un détergent, le Nonidet P-40 à 0,5% ; iii) tampons TEU : TE contenant différentes concentrations d'urée (de 2 à 8 M). Après chaque extraction, les homogénats ont été centrifugés pendant 15 minutes à 15 000 g et les surnageants prélevés. Le premier surnageant de chaque extraction a été gardé à -30°C jusqu'à utilisation. Finalement, le culot correspondant à la dernière extraction dans le tampon contenant de l'urée à 8M a été homogénéisé dans le tampon TUDTT: Tris-HCl 35 mM pH 6,8; urée 8 M; dithiothréitol 50 mM; glycérol 5%; phénylméthylsulfonyl fluoride 0,25 mM et 2 µg/ml de chacun des mêmes inhibiteurs, incubé 30 minutes à 95°C et centrifugé comme précédemment. Les concentrations protéiques ont été mesurées en utilisant le système de Pierce (Coomassie Plus protein assay, Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

#### **Electrophorèse des protéines et immunodétection :**

Les protéines ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE-SDS) dans des gels de 7,5 ou 10% d'acrylamide, ou par électrophorèse bidimensionnelle en présence d'urée, en utilisant le système de Pharmacia (PhastSystem™; Pharmacia LKB). Une isoélectrofocalisation (IEF) ou une électrophorèse interrompue avant l'équilibre de pH (NEpHGE: Non-Equilibrium pH Gel Electrophoresis) ont été réalisées en première dimension, puis une PAGE-SDS a été réalisée en deuxième dimension avec des gels de 12,5% de polyacrylamide. Pour les électrophorèses bidimensionnelles, les protéines des extraits en tampon TENP40 ont été précipitées à l'éthanol, collectées par centrifugation et dissoutes dans 50 mM de Tris-HCl pH 7,4; 8 M

d'urée et 0,5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les protéines marqueurs ainsi que les standards d'électrophorèse bidimensionnelle (2-D SDS-PAGE standards™) de Bio-Rad ont été utilisés comme marqueurs de poids moléculaires ou comme références de points isoélectriques.

- 5 Après électrophorèse, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie ou à l'aide de nitrate d'argent (silver stain plus kit Bio-Rad Lab.), ou transférées sur membrane de nitrocellulose renforcée (Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne). Les membranes ont ensuite été colorées avec du rouge Ponceau ou du Protogold (British BioCell International, Cardiff, UK) et immunodétectées avec les
- 10 anticorps monoclonaux, comme précédemment décrit. Les réactivités ont été révélées avec le kit ECL™ d'Amersham (ECL™ Western blotting kit, Amersham International, Aylesbury, UK), selon le protocole du fabricant.

#### Résultats :

- 15 Le polypeptide de 52-56 kDa a été détecté dans les extraits en tampons TE et TEU (à partir d'une concentration d'urée égale à 6 M), mais pas dans les extraits séquentiels en tampons TENP40 et TUDTT. De plus, si l'extrait en tampon TE était centrifugé pendant 30 minutes à 100 000 x g, Le polypeptide était totalement retrouvé dans le surnageant. L'anticorps monoclonal G36-19 a aussi reconnu
- 20 plusieurs polypeptides de poids moléculaire apparent plus faible, qui n'étaient que partiellement extraits en présence d'urée (même à la concentration de 8 M), et étaient partiellement extraits en présence d'un agent réducteur. Que ce soit en tampon TE ou en présence d'urée, aucun polypeptide n'était immunodétectable dans le dernier des trois extraits réalisés. Ceci indique qu'à chacune des étapes,
- 25 l'extraction était complète. Les expériences de contrôle réalisées en absence d'anticorps primaire ou avec l'anticorps MOPC-21 se sont toujours révélées négatives. Il est probable que les formes de polypeptides de faible poids moléculaire immunodétectées n'étaient pas des produits de dégradation générés durant les étapes d'extraction, puisque leur proportion ne variait pas d'une
- 30 préparation à l'autre et puisque les extractions ont toujours été réalisées en présence d'inhibiteurs de protéases.

#### La cornéodesmosine humaine est un composant des enveloppes cornifiées :

- 35 Afin de confirmer au niveau biochimique que la cornéodesmosine est liée de façon covalente aux enveloppes cornifiées, des fragments, générés par protéolyse d'enveloppes hautement purifiées à partir d'épiderme plantaire humain, ont été analysés avec l'anticorps monoclonal G36-19.

### Préparation et analyse des enveloppes cornifiées :

Des enveloppes cornifiées humaines ont été purifiées à partir de la couche cornée plantaire et d'épiderme mammaire, comme décrit précédemment. Brièvement, les échantillons ont été extraits par ébullitions répétées avec agitation vigoureuse dans une solution contenant 2% de SDS (p/v) et du dithiothréitol à la concentration de 25 mM, puis à 37°C pendant 72 heures dans une solution contenant de l'urée à la concentration de 8 M et du dithiothréitol à la concentration de 25 mM. Les enveloppes extraites en urée ont été sédimentées, puis suspendues dans une solution contenant 0,1% de SDS, de la glycine à la concentration de 192 mM et du Tris à la concentration de 125 mM. Enfin, elles ont été électrodialysées contre ce même tampon pendant 72 heures. Les enveloppes cornifiées purifiées ont été collectées par centrifugation, lavées à l'eau distillée et comptées. Elles ont été analysées morphologiquement, puis par immunofluorescence indirecte, comme décrit dans l'art antérieur. Une digestion à la protéase V8 et une immunodétection des produits de protéolyse ont été réalisées comme décrit dans l'art antérieur.

### Résultats :

Les enveloppes ont été incubées pendant des temps croissants avec la protéase V8, et les fragments produits ont été séparés par SDS-PAGE et immunodétectés. L'anticorps monoclonal G36-19 a fortement marqué un grand nombre de bandes de poids moléculaire apparent supérieur à 50 kDa, dont certaines étaient localisées à la limite supérieure du gel. Ceci indique que la cornéodesmosine est incorporée à l'intérieur de structures hétéropolymériques de grande taille résultant de la protéolyse de l'enveloppe. Plusieurs bandes colorées par le Protogold n'étaient pas immunodétectées, ce qui confirme la spécificité de la réaction. Aucune bande n'était clairement immunodétectée avec l'anticorps monoclonal G36-19 en absence de protéolyse, ce qui prouve l'existence de liens covalents entre la cornéodesmosine et d'autres constituants des enveloppes cornifiées. Aucun des fragments produits par digestion d'enveloppes cornifiées purifiées à partir d'épiderme mammaire n'a été immunodétecté par l'anticorps monoclonal G36-19. En accord avec ce résultat, ces enveloppes étaient beaucoup moins marquées, et seulement à leur périphérie, quand elles étaient analysées avec l'anticorps monoclonal G36-19 en immunofluorescence indirecte.

### La cornéodesmosine humaine de 52-56 kDa est une phosphoprotéine basique :

Pour déterminer le point isoélectrique de la cornéodesmosine, de l'épiderme humain a été extrait directement dans un tampon contenant un détergent

(tampon TENP40), et les protéines extraites ont été séparées par une électrophorèse bidimensionnelle (NEpHGE/SDS-PAGE) et immunodétectées avec l'anticorps monoclonal G36-19. La cornéodesmosine de 52-56 kDa a montré un point isoélectrique basique supérieur à 8. Ce résultat a été confirmé par immunodétection après une séparation IEF/SDS-PAGE. La protéine immunodétectée par l'anticorps monoclonal G36-19 n'était pas visible après coloration au bleu de Coomassie, même quand 100 µg de protéines de l'extrait en tampon TENP40 étaient chargés sur le gel. Ceci suggère donc que la cornéodesmosine de 52-56 kDa est une protéine quantitativement mineure, représentant moins de 0,1% des protéines extraites. De plus, la protéine immunoréactive migrail sous la forme de plusieurs taches juxtaposées, suggérant la présence de modifications post-traductionnelles. Pour analyser l'éventuelle phosphorylation de la cornéodesmosine humaine, celle-ci a été purifiée par affinité sur une matrice de sépharose (HiTrap-NHS, Pharmacia) activée par des groupements N-hydroxysuccinimide puis couplée avec l'anticorps monoclonal G36-19. Puis, elle a été analysée par immunotransfert avec des anticorps spécifiques de la phosphosérine ou de la phosphotyrosine. L'un des cinq anticorps monoclonaux anti-phosphosérine utilisés a immunodétecté la cornéodesmosine de façon spécifique. Au contraire, ni l'anticorps monoclonal PY20 ni un antisérum, dirigés contre la phosphotyrosine, n'ont reconnu la cornéodesmosine.

#### La cornéodesmosine humaine de 52-56 kDa est une glycoprotéine :

##### Affinodétection avec les lectines :

La cornéodesmosine de 52-56 kDa a été partiellement purifiée à partir d'un extrait en tampon TENP40 par chromatographie d'affinité. La cornéodesmosine fixée a été éluée avec 3% de SDS, déposée sur gel d'électrophorèse et transférée sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées dans un tampon de blocage, puis avec des lectines biotinylées vendues par Pierce Chemical Co., diluées à 1 µg/ml: agglutinine de *Pisum sativum* (PSA), de germe de blé (WGA), de *Ricinus communis* (RCA), de *Dolichos biflorus* (DBA) et de *Arachis hypogaea* (PNA). Après rinçage, les lectines ont été détectées avec de la streptavidine marquée avec de la peroxydase (diluée au 1/400 000), et le kit ECL™ d'Amersham, comme décrit plus haut.

##### Expériences de déglycosylation :

L'extrait en tampon TENP40 (10 µg) a été maintenu à ébullition 3 minutes dans 20 µl d'un tampon phosphate de sodium à pH 7,2 contenant 1% (p/v) de SDS. Du

Nonidet P40 et de l'EDTA ont été ajoutés pour atteindre une concentration finale de, respectivement, 1% et 20 mM. 2,4 unités de N-glycosidase F (EC 3.2.2.18, Boehringer Mannheim) ont été ajoutées et le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 6 heures. Les protéines (34 µg) d'un extrait en tampon TENP40 ont aussi été incubées avec 5 mU d'endo- $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase (EC 3.2.1.97) à 37 °C pendant 6 heures, en présence ou non de N-glycosidase F ou de neuraminidase (EC 3.2.1.18), dans les conditions décrites par le fabricant (Oxford GlycoSystems Ltd, Abingdon, UK). Les réactions ont été arrêtées par 2 minutes d'ébullition dans du tampon échantillon. La déglycosylation de la fétuine, utilisée comme contrôle positif, a été testée par PAGE-SDS et avec les lectines biotinylées.

Les échantillons traités et non traités ont été séparés par électrophorèse et analysés par immunodétection et affinodétection, comme décrit plus haut.

#### Chromatographie sur Concanavalline A-Sépharose :

Un extrait en tampon TENP40 a été directement injecté, avec un débit de 0,5 ml/minute, sur une colonne de Concanavalline A sépharose 4B (ConA Sepharose, Sigma) qui avait été équilibrée au préalable avec du tampon de lavage: Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant 0,2 M de NaCl. Après lavage, avec un débit de 1 ml/minute, avec 15 ml de ce tampon, les protéines adsorbées ont été éluées avec un débit de 0,5 ml/minute avec du méthyl- $\alpha$ -D mannopyranoside (Sigma) dilué à 0,5 M dans le tampon de lavage. Les protéines ont ensuite été séparées par PAGE-SDS et analysées comme décrit plus haut.

#### Résultats :

Les protéines d'un extrait en tampon TENP40, contenant la cornéodesmosine de 52-56 kDa, ont été traitées par diverses glycosidases et analysées en immunotransfert avec deux anticorps monoclonaux dirigés contre le polypeptide. La coloration des protéines totales de l'extrait n'a pas montré de dégradation apparente durant l'incubation. Le traitement par la N-glycosidase F a induit une diminution d'environ 5 kDa du poids moléculaire apparent de la cornéodesmosine. Ce résultat suggère très fortement une N-glycosylation. Au contraire, les traitements avec l'endo- $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase et/ou la neuraminidase n'ont pas modifié la migration de la cornéodesmosine. Pour confirmer ce résultat, la cornéodesmosine humaine a été purifiée par affinité et analysée à l'aide de lectines biotinylées. L'agglutinine de germe de blé (WGA) a fortement lié la protéine purifiée, à l'inverse des autres lectines testées qui ne l'ont pas ou très faiblement reconnue. De plus, la cornéodesmosine s'est liée à de

la concanavaline A couplée à une matrice de sépharose. Elle a pu être éluée avec le méthyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside, sucre spécifique de cette lectine, à la concentration de 0,5 M, ce qui prouve la spécificité de la liaison.

5 **Purification de la cornéodesmosine :**

Après clivage dermo-épidermique, l'épiderme a été homogénéisé dans un tampon TEA: Tris-HCl 40 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; aprotinine 10  $\mu$ g/ml et 4-(2-aminoéthyl)-benzènesulfonyl fluoride (Interchim, Paris, France) utilisé à 0,8 mM. L'homogénat a été centrifugé pendant 15 minutes à 15000 g. Le surnageant a été  
10 clarifié par filtration sur des filtres dont le diamètre des pores est de 0,45  $\mu$ m (Puradisc <sup>TM</sup> 25 AS; Whatman, Clifton, NJ), et injecté avec un débit de 0,3 ml/minute sur une colonne échangeuse d'anion (Hi Trap Q, Pharmacia LKB) qui avait été équilibrée dans le tampon de lavage: Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Les protéines non retenues (soit environ 5% des protéines totales de l'extrait) ont été  
15 directement injectées au même débit sur une colonne d'affinité préparée comme suit: environ 2 mg de l'anticorps monoclonal F28-27 ont été couplés à 1 ml de matrice de Sépharose 4B activée par des groupements N-hydroxysuccinimide (HiTrap-NHS), comme cela est préconisé par le fabricant Pharmacia LKB. La colonne a été lavée de façon exhaustive avec un débit de 1 ml/minute avec le  
20 tampon de lavage en présence puis en absence de 1 M de NaCl. Les protéines immunoabsorbées ont été éluées avec un débit de 0,3 ml/minute avec 0,2 M de glycine à pH 2,5; le pH des fractions éluées a été immédiatement neutralisé avec du Tris base à la concentration de 2 M. Les protéines des différentes fractions ont été analysées en immunotransfert avec l'anticorps monoclonal G36-19, ou avec  
25 l'anticorps monoclonal de contrôle, MOPC-21. Les fractions contenant les protéines ainsi éluées ont été mélangées, puis lyophilisées. Les protéines du lyophilisat ont été analysées comme décrit plus haut, par électrophorèse mono- ou bidimensionnelle. La cornéodesmosine a été ensuite découpée du gel afin d'être séquencée.

30

**Résultats :**

La cornéodesmosine de 52-56 kDa a été purifiée par une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie d'affinité. La totalité de la cornéodesmosine extraite s'est liée de façon spécifique sur la colonne d'affinité,  
35 dont elle a pu être éluée en présence de glycine. La coloration au Protogold des protéines transférées montre le haut degré de purification obtenu, puisque la cornéodesmosine est largement majoritaire dans ces fractions. Des résultats similaires ont été obtenus, lorsque la chromatographie d'affinité était réalisée sur

une matrice couplée avec l'anticorps monoclonal F28-27 ou avec l'anticorps monoclonal G36-19. Une analyse en gel bidimensionnel a confirmé le point isoélectrique basique de la cornéodesmosine purifiée et a montré qu'elle est la seule protéine éluée présentant un poids moléculaire apparent de 52-56 kDa. La cornéodesmosine ainsi purifiée a été séparée par électrophorèse et la bande du gel contenant cette protéine a été découpée, puis la protéine a été séquencée.

#### Instabilité du polypeptide purifié :

Au cours de ses nombreux essais pour purifier la cornéodesmosine, la demanderesse s'est heurtée à deux problèmes majeurs : (1) la faible proportion de cette protéine parmi les protéines épidermiques et (2) son instabilité, due vraisemblablement à sa grande sensibilité à l'action des protéases.

Différents tests ont été mis en œuvre pour tenter de stabiliser la cornéodesmosine : adjonction de zinc (inhibiteur de l'enzyme chymotrypsique de la couche cornée), d'agents réducteurs ( $\beta$ -mercaptoéthanol ou dithiothréitol), d'agents dénaturants (SDS), de glycérol, d'inhibiteurs spécifiques des protéases à sérine (PMSF, aprotinine) ou d'un cocktail d'inhibiteurs de diverses protéases (aprotinine, leupeptine, pepstatine, benzamidine, phénanthroline, PMSF) ou suppression des étapes de congélation / décongélation. Finalement, l'absence des étapes de congélation/décongélation, la présence de 2% de SDS ou la présence du cocktail d'inhibiteurs, et de préférence une combinaison de ces conditions, se sont révélées les plus efficaces pour stabiliser la cornéodesmosine.

#### Séquençage du polypeptide purifié :

Pour le séquençage, les bandes qui correspondent à la cornéodesmosine ou à des fragments de cornéodesmosine (52-56 kDa, 45 kDa), mises en évidence sur les gels d'électrophorèse ont été découpées. Les protéines ont alors été directement digérées dans le gel par de l'endopeptidase lys-C (EC 3.4.99.30) et les peptides générés ont été purifiés par HPLC en utilisant une colonne DEAE-C18. Les peptides ainsi sélectionnés ont été séquencés par la méthode des cycles de dégradation d'Edman sur un appareil Procise Sequencer de la société Applied Biosystems, selon les instructions du fournisseur.

#### Résultats :

Aucun séquençage à partir de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale n'a été possible, suggérant une protection de la protéine à cette extrémité. Les séquençages internes ont permis d'établir la séquence de deux fragments à savoir :

A : KSYGGYEWGGSSDSY

B : KIYPVGYFTK

- 5 Ce résultat confirme celui obtenu par les techniques de biologie moléculaire ayant permis la déduction de la séquence en acides aminés du polypeptide de l'invention à partir de la séquence nucléotidique.

**Construction d'une banque d'expression d'épiderme humain :**

- 10 Le clonage de l'ADNc de la cornéodesmosine humaine ne pouvait pas être réalisé à partir des banques d'expression préexistantes. En effet, celles-ci ont été produites soit à partir d'épiderme de souris, soit à partir de kératinocytes humains cultivés en monocouche, conditions qui ne permettent pas l'expression des gènes caractéristiques de la différenciation terminale épidermique. La demanderesse a donc construit une banque d'expression épidermique humaine.

15

**Extraction d'acides ribonucléiques (ARN) poly(A)<sup>+</sup> d'épiderme humain :**

- Elle a été réalisée à partir de prélèvements de peau mammaire, déchets chirurgicaux obtenus après chirurgie plastique. Le tissu adipeux sous-cutané a été disséqué, puis des lambeaux de peau ont été découpés à l'aide d'un dermatome et incubés 2 heures à 37°C, dans une solution de trypsine (solution A, Gibco BRL), face épidermique vers le haut. Le clivage dermo-épidermique a été alors réalisé avec des pinces. Les feuillets épidermiques obtenus ont été rincés dans un tampon phosphate (PBS, pH 7,4). L'extraction des ARN poly(A)<sup>+</sup> a été réalisée selon le protocole proposé dans le coffret "mRNA purification kit" commercialisé par Dynal (Oslo), après homogénéisation des feuillets à l'aide d'un "Turax", directement dans le tampon fourni (Lysis/Binding buffer). Le principe de ce coffret utilise l'affinité des ARN messagers (ARNm) comportant une extrémité poly(A) pour des billes magnétiques recouvertes d'oligo(dT)<sub>25</sub>. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante dans le lysat, les billes ont été isolées avec un aimant et soumises à 3 lavages. Les ARN poly(A)<sup>+</sup> élués par incubation des billes à 65°C pendant 2 minutes dans une solution 2 mM EDTA, pH 8, ont été dosés en utilisant le coffret colorimétrique "DNA DipStick" commercialisé par Invitrogen (San Diego, CA).

- 35 **Construction de la banque :**

La banque a été construite avec le coffret "ZAP Express cDNA Gigapack II Gold cloning kit" commercialisé par Stratagene (La Jolla, CA), en suivant le protocole proposé par le fournisseur. Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés



à partir de 2 µg d'ARN poly(A)<sup>+</sup>, avec la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV-RT), en utilisant des amorces oligo(dT)<sub>18</sub> comprenant un site de restriction pour l'enzyme XhoI et en présence de 5-méthyl cytidine triphosphate. La synthèse du second brin a été réalisée par l'ADN polymérase I de E. coli, et les extrémités des ADNc ont été rendues franches avec la pfu polymérase recombinate. Après addition d'adaptateurs EcoR I (ADN ligase de T4), et phosphorylation des extrémités 5' (polynucléotide kinase de T4), les ADNc ont été soumis à une digestion par l'enzyme Xho I. La sélection des ADNc de taille supérieure à 500 paires de bases a été réalisée avec une colonne de Sephacryl S-500. La ligation des ADNc avec les deux bras du phage ZAP Express a été réalisée avec la ligase du phage T4. L'encapsulation du phage recombinant a été réalisée avec les extraits "Gigapack II Gold Packaging Extract" fournis par Stratagene. La souche XL-1 blue MRF' de E. coli a été utilisée pour la titration et l'étalement de la banque.

#### Résultats :

Cette banque a été réalisée à partir de 2 µg d'ARNm, extraits d'un fragment d'épiderme humain dans les heures suivant son prélèvement, par clonage unidirectionnel dans le phage ZAP Express. Elle est constituée d'environ 2x10<sup>5</sup> clones indépendants.

#### Clonage de l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) codant pour la cornéodesmosine :

##### Criblage immunologique :

Le criblage immunologique, réalisé sans étape d'amplification préalable, a été fait sur des membranes de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne), incubées dans une solution d'isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG, Stratagene) à 10 mM pendant 10 minutes, séchées, et incubées 4h à 37°C sur la banque étalée. La procédure de criblage immunologique a été réalisée comme décrit dans l'art antérieur avec un cocktail des trois anticorps monoclonaux G36-19, F28-27 et B17-21, utilisés aux concentrations respectives de 0,2, 0,2 et 2 µg/ml. Les clones positifs ont été isolés par les techniques classiques et testés avec chacun des trois anticorps monoclonaux isolément.

##### Séquençage :

Les phages ZAP Express correspondant aux clones purifiés ont été soumis à une excision *in vivo*, avec l'aide d'un phage ExAssist, comme indiqué par Stratagene. Les plasmides obtenus ont été amplifiés avec le coffret Qiagen (Hilden,

Allemagne), puis séquencés aux extrémités des inserts, avec des amorces T3 et M13 (Stratagene), en utilisant un coffret Perkin-Elmer (ABI PRISM Dye Terminator cycle sequencing kit, Perkin Elmer, Foster city, CA). La comparaison des séquences obtenues avec les bases de données internationales a été  
5 réalisée avec le programme Blast.

### Résultats :

La banque n'ayant pas été amplifiée préalablement, le criblage a permis d'isoler 5 clones indépendants. Les fragments d'ADNc humain contenus dans les clones  
10 ont été séquencés partiellement à partir des extrémités, ce qui a permis de montrer qu'ils étaient tous chevauchants et codaient donc tous pour des fragments de la même protéine. Les 5 clones ont aussi été testés avec chacun des trois anticorps monoclonaux séparément. Trois clones (1.1, 4.4 et 5.1) se sont révélés réactifs avec les trois anticorps monoclonaux, le clone 5.5 avec deux  
15 anticorps monoclonaux (F28-27 et G36-19) et enfin le clone 1.2 n'a été reconnu que par l'anticorps monoclonal F28-27. Ces résultats démontrent de manière formelle que les trois anticorps monoclonaux reconnaissent la même protéine, confirmant ainsi ce qui avait été fortement suggéré par les études biochimiques antérieures. Ces résultats permettent également d'ordonner sur la molécule les  
20 épitopes reconnus par chacun des anticorps monoclonaux. En effet, les clones ayant été construits par transcription inverse à partir de l'extrémité 3' des ARNm, qui correspond à l'extrémité COOH de la protéine, il est possible de conclure que l'épitope reconnu par F28-27 est le plus proche de cette extrémité, suivi de l'épitope de G36-19 et enfin de celui de B17-21. L'analyse par restriction  
25 enzymatique de la taille de ces différents fragments d'ADNc, a confirmé que les 3 clones reconnus par les 3 anticorps monoclonaux présentent les plus longues séquences (de 2 à 1,5 kb), alors que celui que reconnaît seulement F28-27 est le plus court (1 kb), le dernier, reconnu par 2 anticorps monoclonaux, ayant une taille intermédiaire de 1,3 kb.

30 Ainsi, a été cloné tout ou partie de l'ADNc codant pour la cornéodesmosine humaine, protéine caractérisée par les 3 anticorps monoclonaux B17-21, G36-19 et F28-27 qui reconnaissent des épitopes différents, ordonnés sur la protéine dans l'ordre indiqué, de l'extrémité NH2 vers l'extrémité COOH.

35 Les séquences partielles de chaque clone, comparées aux séquences incluses dans les banques de données internationales, ont révélé une identité de 99% avec la séquence du gène S, inscrit dans la banque de données GenBank sous le numéro L20815. Cette analyse a montré également que parmi les 5 clones

obtenus, 4 correspondent à la forme courte de l'ARNm, un seul, le clone 5.1, correspondant à la forme longue. Ces formes sont issues d'un choix alternatif du site de polyadénylation au niveau de la partie 3' non codante du transcrit primaire. Cette analyse a permis de préciser la localisation des épitopes reconnus par nos 3 anticorps monoclonaux : l'épitope reconnu par B17-21 est localisé dans la partie de la protéine correspondant aux nucléotides 594 à 762, G36-19 et F28-27 étant respectivement localisés dans la zone 762-1044 et 1044-codon stop. Enfin, le clone 1.1, qui comporte la séquence codante la plus longue, commence au nucléotide 348.

#### **Clonage de l'ADNc complet codant pour la cornéodesmosine :**

Les analyses précédentes ont montré que les clones obtenus ne couvraient pas la partie de l'ADNc allant du nucléotide 1 au nucléotide 347. La demanderesse a donc dû cloner cette partie manquante.

80 ng d'ARN poly(A)<sup>+</sup> extrait d'épiderme humain comme précédemment décrit, ont été soumis à une transcription inverse à partir d'amorces aléatoires, en utilisant le coffret "SuperScript" commercialisé par Gibco BRL. L'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc de la cornéodesmosine a été réalisée à partir de 1/20 de la réaction de synthèse du premier brin, avec en amont un oligonucléotide correspondant à la séquence 2-20 (GenBank L20815) et comprenant aussi un adaptateur Spe I, et, en aval un oligonucléotide complémentaire de la séquence 1017-1035. Les conditions de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR : polymérase chain reaction) étaient les suivantes : 3 minutes à 94°C suivies de 35 cycles avec 80 sec à 94°C, 80 sec à 57°C et 2 minutes à 72°C. Le fragment unique obtenu, purifié après électrophorèse en gel d'agarose TBE, digéré par Spe I et EcoN I (nucléotides 2 à 1003), a été cloné dans le plasmide pBK-CMV-1.1 (isolé par criblage de la banque) digéré par les mêmes enzymes, ce qui a permis d'aboutir au plasmide pS11. L'ADNc complet contenu dans le plasmide pS11 a été séquencé au moins 3 fois jusqu'au nucléotide 1700. La comparaison avec la séquence antérieurement publiée a révélé quatre différences ponctuelles qui ont été analysées au niveau génomique.

#### **Analyse génomique de la cornéodesmosine :**

Quatre différences ponctuelles ont été constatées entre la séquence de l'ADNc complet isolé par la demanderesse et celle du gène S publiée dans l'art antérieur (Zhou Y. et Chaplin D.D., P.N.A.S. usa, Vol. 90, pp. 9470-9474, Octobre 1993). Ces quatre différences ponctuelles ont été analysées par PCR, au niveau génomique à partir de dix échantillons témoins d'ADN extrait de sang humain

selon les méthodes classiques.

L'analyse de l'insertion éventuelle d'une guanine en position 1514 a été réalisée après amplification par PCR de la région génomique comprise entre les nucléotides 1446 et 1786 (GenBank, L20815), réalisée dans les conditions classiques. Le fragment d'ADN obtenu pour chaque échantillon a été soumis à une digestion par Bsi MI d'une part et Nci I d'autre part. Une électrophorèse sur gel NuSieve GTG 3% (FMC, Rockland, ME) a été réalisée en tampon TBE.

L'étude de la séquence en position 66 a été réalisée selon la méthode ASA (allele specific amplification). Deux réactions de PCR ont été réalisées en parallèle avec en aval, un oligonucléotide complémentaire de la séquence 572-91 et, en amont, un oligonucléotide correspondant à la séquence 52-65 et se terminant en position 66 soit par A soit par T. Les réactions de PCR ont été réalisées avec 0,5 µg d'ADN génomique, 2,5 pmol de chaque oligonucléotide, et 0,5 U de Taq polymérase (Appligene). Les conditions d'amplification sont 94°C, 2 minutes puis 30 cycles avec 50 secondes à 94°C, 1 minute à 56°C et 2,5 minutes à 72°C.

L'analyse des bases en position 1118 et 1236 a été réalisée après amplification avec un couple d'oligonucléotides unique : oligonucléotide sens 908-27, antisens 1573-93. Les conditions de PCR sont les mêmes que précédemment, avec un temps de polymérisation limité à 1 minute. Les fragments ont été soumis à une digestion par Bsm I ou Hin6 I pour l'étude respective des positions 1118 et 1236 puis séparés par électrophorèse sur gel NuSieve 3%.

#### Résultats :

L'insertion d'une guanine en position 1514 entraîne un décalage du cadre de lecture et déplace le codon stop de la position 1523 à la position 1603. La protéine produite par cette séquence diffère au niveau des deux derniers acides aminés (I et S) qui sont remplacés par la séquence :

DILAQVKPLGPQLADPEVFLPQGELLDSP

ce qui correspond à un ajout de 27 acides aminés par rapport à la séquence publiée. Les 5 ADNc précédemment isolés présentant tous cette insertion, l'étude a été élargie à d'autres individus. Dix échantillons témoins d'ADN génomique humain, provenant de dix individus, ont été amplifiés dans cette région et analysés par restriction enzymatique. En effet la séquence publiée correspond à la présence d'un site de restriction Bsi MI en position 1510 qui disparaît dans la séquence comprenant une guanine supplémentaire, alors qu'un site Nci I apparaît en 1512. Les résultats sont les mêmes pour les 10 individus, à savoir que seul le site Nci I est présent. Ceci signifie que chez ces dix individus, la

cornéodesmosine est produite sous une forme plus longue que la forme publiée du gène S.

Trois autres différences ponctuelles, de type substitutions, ont été retrouvées entre les clones et la séquence publiée. L'analyse des dix échantillons génomiques témoins par PCR et restriction enzymatique ou par ASA, a montré qu'il s'agit d'un polymorphisme du gène. La demanderesse a mis en évidence en position 66 une mutation conservative T/A (Leu-Met), en position 1118, un polymorphisme A/G, correspondant à une mutation silencieuse Ala-Ala et, enfin, en 1236 un polymorphisme T/G correspondant à une mutation non conservative Ser-Ala.

#### **Production de cornéodesmosine recombinante :**

L'ADNc complet codant pour la cornéodesmosine a été isolé, sous la forme d'un fragment Ecl136 I/Not I de 2106 paires de bases à partir du plasmide pS11. Le sous-clonage a été réalisé dans le vecteur pCDNA amp (Invitrogen) préalablement digéré par EcoR V et Not I, aboutissant au plasmide p14-9.

La traduction *in vitro* de la cornéodesmosine, a été effectuée avec le coffret "TNT T7 Quick coupled transcription/translation system" commercialisé par Promega, à partir du plasmide p14-9. Ce coffret associe en une étape, la transcription par l'ARN polymérase du phage T7, avec la traduction par un lysat de réticulocytes de lapin. Ces réactions ont été réalisées avec 0,6 µg de plasmide dans un volume de 25 µl, selon les instructions du fournisseur.

La cornéodesmosine a été exprimée dans des cellules COS-7 après transfection avec le plasmide p14-9. Les cellules ont été transfectées selon le protocole classique au DEAE-dextran, complété par l'addition de chloroquine et un choc au DMSO, en utilisant 1 µg de plasmide/ $3 \cdot 10^5$  cellules. Après 48 h d'expression, les cellules sont lavées 2 fois au PBS pH 7,4 et lysées dans un tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, NP40 0,5%, contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Pharmingen, Inc). Après séparation en SDS-PAGE, et électrotransfert, les échantillons sont immunodétectés, comme précédemment décrit.

#### **Résultats :**

La nouvelle séquence complète de la protéine prédit un poids moléculaire de 51,45 kDa, en absence de toute modification post-traductionnelle. La cornéodesmosine synthétisée *in vitro*, en absence de membranes microsomales, migre avec un poids moléculaire apparent d'environ 60 kDa. Ceci montre que cette protéine a une migration aberrante en gel SDS-PAGE. La co-migration avec la forme épidermique majoritaire extraite en tampon de faible force ionique,

démontre que cette dernière correspond à une forme assez largement tronquée de la protéine, ceci d'autant plus que la demanderesse a montré que cette forme épidermique est glycosylée.

- 5 La transfection de cellules COS-7 avec le plasmide 14-9 fait apparaître une protéine immunoréactive qui migre également aux environs de 60 kDa. Les mêmes résultats ont été obtenus avec la lignée de neuroépithéliome humain CHP 126, transfectée par électroporation. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que dans l'épiderme, la cornéodesmosine subit, de manière précoce au cours de sa maturation, une protéolyse spécifique.

10

## REVENDECATIONS

1. Polypeptide naturel ou synthétique purifié, caractérisé par le fait qu'il répond à la séquence d'acides aminés :

```

1  M G S S R A P W M G R V G G H G M M A L L L A G L
26 L L P G T L A K S I G T F S D P C K D P T R I T S
51 P N D P C L T G K G D S S G F S S Y S G S S S S G
76 S S I S S A R S S G G G S S G S S S G S S I A Q G
101 G S A G S F K P G T G Y S Q V S Y S S G S G S S L
126 Q G A S G S S Q L G S S S S H S G S S G S H S G S
151 S S S H S S S S S S F Q F S S S S F Q V G N G S A
176 L P T N D N S Y R G I L N P S Q P G Q S S S S S Q
201 T S G V S S S G Q S V S S N Q R P C S S D I P D S
226 P C S G G P I V S H S G P Y I P S S H S V S G G Q
251 R P V V V V V D Q H G S G A P G V V Q G P P C S N
276 G G L P G K P C P P I T S V D K S Y G G Y E V V G
301 G S S D S Y L V P G M T Y S K G K I Y P V G Y F T
326 K E N P V K G S P G V P S F A A G P P I S E G K Y
351 F S S N P I I P S Q S A A S S A I A F Q P V G T G
376 G V Q L C G G G S T G S K G P C S P S S S R V P S
401 S S S I S S S A G S P Y H P C G S A S Q S P C S P
426 P G T G S F S S S S S S Q S S G K I I L Q P C G S
451 K S S S S G H P C M S V S S L T L T G G P D G S P
476 H P D P S A G A K P C G S S S A G K I P C R S I R
501 D I L A Q V K P L G P Q L A D P E V F L P Q G E L
526 L D S P

```

5

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de mammifères.

10 3. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de peau de mammifères.

4. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir de peau humaine.

15 5. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est purifié à partir d'épiderme humain.

6. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il intervient dans la cohésion intercornéocytaire.

20

7. Polypeptide dont la séquence est en partie constituée par la séquence du

polypeptide tel que décrit dans la revendication 1.

8. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il a un poids moléculaire apparent compris entre 50 et 60 kilodaltons, 5  
préférentiellement entre 52 et 56 kilodaltons.

9. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est basique.

10 10. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est glycosylé.

11. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est phosphorylé.

15

12. Polypeptide selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est glycosylé, basique, phosphorylé et qu'il a un poids moléculaire apparent compris entre 50 et 60 kilodaltons, préférentiellement entre 52 et 56 kilodaltons.

20 13. Mélange de polypeptides issus de la protéolyse du polypeptide tel que décrit dans les revendications 1 à 12.

14. Composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide ou un mélange de 25  
polypeptides tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 13.

15. Procédé de traitement cosmétique destiné à traiter les troubles trophiques cutanés ou ceux consécutifs à des troubles de la cicatrisation, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau du sujet à traiter une composition cosmétique 30  
telle que décrite dans la revendication 14.

16. Procédé de traitement cosmétique destiné à traiter l'amaigrissement de l'épiderme, et en particulier de la couche cornée, et/ou à traiter une fragilité excessive du revêtement cutané et/ou à renforcer la cohésion intercornéocytaire 35  
et/ou induire l'épaississement de la couche cornée, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau du sujet à traiter une composition telle que décrite dans la revendication 14.



17. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 destinée à traiter les troubles trophiques cutanés ou ceux consécutifs à des troubles de la cicatrisation.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 destinée à traiter l'amaigrissement de l'épiderme et en particulier de la couche cornée et/ou à traiter une fragilité excessive du revêtement cutané et/ou à renforcer la cohésion intercornéocytaire et/ou induire l'épaississement de la couche cornée.

19. Composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'au moins une protéase active sur le polypeptide selon l'une des revendications 1 à 12, choisie parmi l'Endoprotéinase LysC, l'Endoprotéinase GluC, la Proline-Endopeptidase, la Thrombine, la Pepsine, la Myxobacter AL117 et l'Elastase.

20. Composition selon la revendication 19, caractérisée par le fait qu'elle comprend en outre une glycosidase.

21. Procédé de traitement cosmétique pour diminuer la cohésion intercornéocytaire ou pour favoriser la desquamation, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau du sujet à traiter une composition telle que décrite dans les revendications 19 ou 20.

22. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 19 ou 20 destinée à traiter l'hyperkératose.

23. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 19 ou 20 destinée à traiter la xérose, les ichthyoses, le psoriasis, les lésions tumorales hyperkératosiques bénignes ou malignes ou les kératoses réactionnelles.

24. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 19 ou 20 destinée à traiter la leukokératose du col utérin au cours du prolapsus, les leukokératoses buccales, ou encore les lésions tumorales hyperkératosiques bénignes ou malignes des muqueuses malpighiennes.

26. Séquence nucléotidique codant pour le polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 12.

27. Fragment isolé d'acide désoxyribonucléique comprenant au moins la séquence nucléotidique codante suivante :

```

1   ATG GGC TCG TCT CGG GCA CCC TGG ATG GGG CGT GTG GGT GGG CAC
46  GGG ATG ATG GCA CTG CTG CTG GCT GGT CTC CTC CTG CCA GGG ACC
5   91  TTG GCT AAG AGC ATT GGC ACC TTC TCA GAC CCC TGT AAG GAC CCC
136 ACG CGT ATC ACC TCC CCT AAC GAC CCC TGC CTC ACT GGG AAG GGT
181 GAC TCC AGC GGC TTC AGT AGC TAC AGT GGC TCC AGC AGT TCT GGC
226 AGC TCC ATT TCC AGT GCC AGA AGC TCT GGT GGT GGC TCC AGT GGT
271 AGC TCC AGC GGA TCC AGC ATT GCC CAG GGT GGT TCT GCA GGA TCT
10  316 TTT AAG CCA GGA ACG GGG TAT TCC CAG GTC AGC TAC TCC TCC GGA
361 TCT GGC TCT AGT CTA CAA GGT GCA TCC GGT TCC TCC CAG CTG GGG
406 AGC AGC AGC TCT CAC TCG GGA AGC AGC GGC TCT CAC TCG GGA AGC
451 AGC AGC TCT CAT TCG AGC AGC AGC AGC TTT CAG TTC AGC AGC
496 AGC AGC TTC CAA GTA GGG AAT GGC TCT GCT CTG CCA ACC AAT GAC
15  541 AAC TCT TAC CGC GGA ATA CTA AAC CCT TCC CAG CCT GGA CAA AGC
586 TCT TCC TCT TCC CAA ACC TCT GGG GTA TCC AGC AGT GGC CAA AGC
631 GTC AGC TCC AAC CAG CGT CCC TGT AGT TCG GAC ATC CCC GAC TCT
676 CCC TGC AGT GGA GGG CCC ATC GTC TCG CAC TCT GGC CCC TAC ATC
721 CCC AGC TCC CAC TCT GTG TCA GGG GGT CAG AGG CCT GTG GTG GTG
20  766 GTG GTG GAC CAG CAC GGT TCT GGT GCC CCT GGA GTG GTT CAA GGT
811 CCC CCC TGT AGC AAT GGT GGC CTT CCA GGC AAG CCC TGT CCC CCA
856 ATC ACC TCT GTA GAC AAA TCC TAT GGT GGC TAC GAG GTG GTG GGT
901 GGC TCC TCT GAC AGT TAT CTG GTT CCA GGC ATG ACC TAC AGT AAG
946 GGT AAA ATC TAT CCT GTG GGC TAC TTC ACC AAA GAG AAC CCT GTG
25  991 AAA GGC TCT CCA GGG GTC CCT TCC TTT GCA GCT GGG CCC CCC ATC
1036 TCT GAG GGC AAA TAC TTC TCC AGC AAC CCC ATC ATC CCC AGC CAG
1081 TCG GCA GCT TCC TCG GCC ATT GCG TTC CAG CCA GTG GGG ACT GGT
1126 GGG GTC CAG CTC TGT GGA GGC GGC TCC ACG GGC TCC AAG GGA CCC
1171 TGC TCT CCC TCC AGT TCT CGA GTC CCC AGC AGT TCT AGC ATT TCC
30  1216 AGC AGC GCC GGT TCA CCC TAC CAT CCC TGC GGC AGT GCT TCC CAG
1261 AGC CCC TGC TCC CCA CCA GGC ACC GGC TCC TTC AGC AGC AGC TCC
1306 AGT TCC CAA TCG AGT GGC AAA ATC ATC CTT CAG CCT TGT GGC AGC
1351 AAG TCC AGC TCT TCT GGT CAC CCT TGC ATG TCT GTC TCC TCC TTG
1396 ACA CTG ACT GGG GGC CCC GAT GGC TCT CCC CAT CCT GAT CCC TCC
35  1441 GCT GGT GCC AAG CCC TGT GGC TCC AGC AGT GCT GGA AAG ATC CCC
1486 TGC CGC TCC ATC CGG GAT ATC CTA GCC CAA GTG AAG CCT CTG GGG
1531 CCC CAG CTA GCT GAC CCT GAA GTT TTC CTA CCC CAA GGA GAG TTA
1576 CTC GAC AGT CCA TAA

```

40 28. Séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique telle décrite à l'une des revendications 26 ou 27.

29. Composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, une séquence telle que décrite dans l'une  
45 quelconque des revendications 26 à 28.

30. Utilisation de la séquence d'acide telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 26 à 28 pour préparer un polypeptide ou un mélange de polypeptides tels que décrits dans les revendications 1 à 13.

50

31. Utilisation de la séquence d'acide telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 26 à 28 pour préparer un acide ribonucléique.

32. Utilisation du polypeptide purifié ou de ses fragments de protéolyse purifiés ou de tout peptide synthétique tel que décrit dans les revendications 1 à 13, pour préparer ou purifier toute molécule susceptible de se lier spécifiquement audit polypeptide purifié ou auxdits fragments de protéolyse purifiés ou audit peptide synthétique.

33. Utilisation selon la revendication précédente pour préparer ou purifier des protéines structurales spécifiques de cornéodesmosomes ou des enzymes de la couche cornée de type "protéases" ou "glycosidases".

34. Utilisation du polypeptide purifié ou de ses fragments de protéolyse purifiés ou de tout peptide synthétique tel que décrit dans les revendications 1 à 13, pour préparer ou purifier des antisérums ou des anticorps monoclonaux spécifiques.